

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

2H BA

TRANSLATION ACES

29 Broadway ♦ Suite 2301

New York, NY 10006-3279

Tel. (212) 269-4660 ♦ Fax (212) 269-4662



[Translation from German]

(19) FEDERAL REPUBLIC
OF GERMANY

GERMAN PATENT
OFFICE

(12) **Letters of Disclosure**
(10) **DE 4,138,042 A 1**

(21) File No.: P 41 38 042.8
(22) Application date: Nov. 19, 1991
(43) Laid open to public
inspection June 27, 1993

(51) Int. Cl.⁵:
C 07 D 493/04
C 12 P 17/18
A 01 N 43/90
A 01 N 63/02
C 07 G 11/00
A 61 K 31/425
/(C07D 493/04,
303:00)C07D
313:00, 277:24,
(C12P 17/18,
C12R 1:01)

(71) Applicant:
Gesellschaft für Biotechnologische
Forschung mbH (GBF) 3300
Braunschweig, Germany

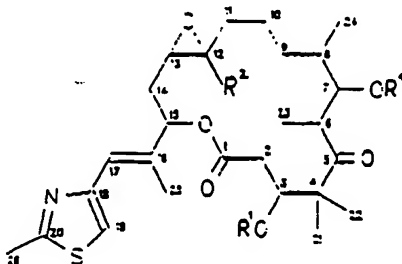
(72) Inventors:
Prof. Dr. Gerhard Höfle; Dr. Herbert
Bedorf; Dr. Klaus Gerth; Prof. Dr.
Hans Reichenbach; 3300
Braunschweig, Germany

(74) Agent:
H. Boeters, Graduate Chemist. Ph. D.,
R. Bauer, Graduate Engineer, Patent Attorneys, 8000 Munich

Examination requested pursuant to Section 44, Patent Law.

(54) Epothilones, method of preparation, and agents containing them

(57) The invention relates to epothilones having the following general formula:

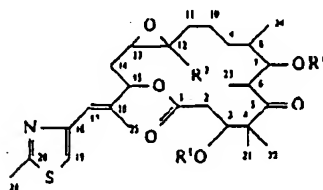


process of preparation, and epothilone-containing agents.

DE 4,138,042 A1

Description

The invention relates to epothilones of the following general formula:



wherein R^1 represents hydrogen, C_1 - C_4 -alkyl, C_1 - C_4 -acyl, Li^+ , K^+ , Na^+ , $\frac{1}{2} Mg^{2+}$ or $\frac{1}{2} Ca^{2+}$ and R^2 is hydrogen or a methyl group.

Furthermore, the invention relates to an epothilone characterized by one or more of the following parameters:

1H -NMR data atom		^{13}C -NMR data atom	
2a	2.4	1	170.5
2b	2.52	2	39.1
3	4.19	3	73.2
6	3.2	4	53.0
7	3.78	5	219.9
8	1.73	6	43.5
9a	1.4	7	74.7
9b	1.52	8	36.4
10a	1.4	9	30.7
10b	1.4	10	23.6
11a	1.42	11	27.6
11b	1.7	12	57.4
12	2.9	13	54.6
13	3.01	14	31.7
14a	1.85	15	76.8
14b	2.11	16	137.4
15	5.41	17	120.1
17	6.6	18	152.1
19	6.99	19	116.3
21*)	1.08	20	165.0
22*)	1.35	21*)	20.4
23	1.15	22*)	21.6
24	0.93	23	14.1
25	2.05	24	17.1
26	2.69	25	15.6
		26	19.1

*) Assignment interchangeable.

C₂₆H₃₉NO₆S (493)

FAB-MS (neg. ions): 429.25 for (M-H)⁻

UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR, film on Intran:

ν : 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979 cm⁻¹.

TLC: R_F = 0.75.

TLC – Aluminum foil 60 F₂₅₄ Merck; solvent:

Dichloromethane/methanol = 90 : 10

Detection:

1. UV extinction at 254 nm
2. Spraying with vanillin-sulfuric acid reagent and heating to 120°C: brown coloration.

HPLC: R_t = 5.4 min.

Column: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7 μ m, Merck;

Flow rate: 1.5 mL/min; solvent: methanol/water = 65 : 35

Detector: UV 254 nm.

Furthermore, the invention relates to an epothilone characterized by one or more of the following parameters:

¹ H-NMR data		¹³ C-NMR data	
atom		atom	
2a	2.22 dd	1	170.5
2b	2.53 dd	2	39.4
3	4.24 dd	3	72.9
6	3.28 m	4	53.2
7	3.75 dd	5	219.8
8	1.73 m	6	43.1
9a	1.4 m	7	74.3
9b	1.5 m	8	36.6
10a	1.4 m	9	30.9
10b	1.4 m	10	22.5
11a	1.42 m	11	32.3
11b	1.7 m	12	61.3
12	—	13	61.7
13	2.8 dd	14	32.4
14a	1.9 ddd	15	76.9
14b	2.1 ddd	16	137.5
15	5.41 dd	17	120.0
17	6.6 s	18	152.1
19	6.99 s	19	116.2
21 ^{*)}	1.05 s	20	165.1
22 ^{*)}	1.36 s	21 ^{*)}	19.7
23	1.15 d	22 ^{*)}	21.5
24	0.92 d	23	13.7
25	2.05 s	24	17.1
26	2.69 s	25	15.7
27	1.28 s	26	19.0
		27	22.7

(R¹ = CH₃)

^{*)} Assignment interchangeable.

$C_{27}H_{41}NO_6S$ (507)

FAB-MS (neg. ions): 506.25 for $(M-H)^-$

UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR, film on Irtran:

ν : 3400; 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149;
1049; 977 cm^{-1} .

TLC: R_F = 0.75.

TLC – Aluminum foil 60 F₂₅₄ Merck; solvent:

Dichloromethane/methanol = 90 : 10

Detection:

1. UV extinction at 254 nm
2. Spraying with vanillin-sulfuric acid reagent and heating to 120°C: brown coloration.

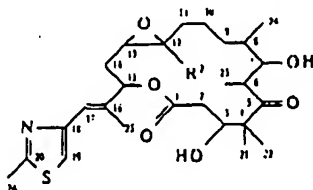
HPLC: R_t = 6.3 min.

Column: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7 μm , Merck;

Flow rate: 1.5 mL/min; solvent: methanol/water = 65 : 35

Detector: UV 254 nm.

Particularly preferred are epothilones having the following structural formula:



wherein R₂ represents hydrogen or methyl. (The carbon atom of the methyl group is denoted as C27). The invention also relates to a process for preparing epothilones, particularly of the above-characterized epothilones, which preparation is characterized in that strain So ce90 DSM 6773

- is cultivated in a medium containing carbon and nitrogen sources and mineral salts,
- an adsorbent resin is added either during or after cultivation of the strain,
- the fermenter broth is separated,
- the epothilones are eluted from the adsorbent resin and
- the eluates are freed from the solvent(s) either directly or by further purification steps,
- and the various epothilones are optionally purified and separated from one another by high-pressure/low-pressure chromatography and/or by recrystallization.

Optionally, the epothilones obtained in this manner can be further converted by current chemical processes, e.g., with bases, into alkali metal and alkaline earth salts and optionally into ethers, or they can be converted with organic acids into the corresponding esters.

Furthermore, the invention relates to a plant-protection agent in agriculture, forestry and/or gardening, consisting of one or more of the aforementioned epothilones or containing one or more of these epothilones, optionally in addition to one or more conventional excipients and/or diluents.

Finally, the invention relates to a therapeutic agent which may exert cytotoxic activities in particular and/or cause immunosuppression, consisting of one or more of the aforementioned epothilones or containing one or more of these epothilones, optionally in addition to one or more conventional excipients and/or diluents.

Below, the invention will be explained in greater detail on the basis of examples and experimental data.

Production strain

Strain So ce90 was isolated in July 1985 at the Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) [Association for Biotechnological Research (GBF)] from a soil sample from the banks of the Zambezi River, South Africa. The strain has been deposited with *the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM)* [German Microorganism Collection (DSM)] under No. 6773.

Stock culture and morphological description: The strain grows on cellulose as the sole carbon and energy source with KNO_3 as the sole nitrogen source, e.g., on filter paper over ST21 mineral salt agar (0.1% KNO_3 ; 0.1% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 0.1% $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$; 0.1% K_2HPO_4 ; 0.01% $\text{MnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 0.02% FeCl_3 ; 0.002% yeast extract; standard trace-element solution: 1 % agar). Formed on this medium are dark red-brown to dark black-brown fruiting bodies consisting of small sprangioles (about 15 to 30 μm in diameter) in more or less large dense clusters and packets.

The strain grows very well with glucose and KNO_3 , e.g., on CA2 agar (basic medium: 1.5 g of agar in 92 mL of distilled water; Stock solution 1: 7.5% KNO_3 , 7.5% K_2HPO_4 in distilled water; Stock solution 2: 1.5% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ in distilled water; Stock solution 3: 0.2% $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$; 0.15 % FeCl_3 in distilled water; Stock solution 4: 20% glucose in distilled water. The stock solutions are sterilized by autoclaving. 1 mL each of Solutions 1 to 3 and 5 mL of Solution 4 are added to the basic medium, as is a suitable amount of a trace element solution).

The vegetative rodlets have the shape typical of Sorangium (relatively coarse cylindrical rodlets with widely rounded ends which have an average length of 3-6 μm and an average thickness of 1 μm) and are dark in the phase-contrast microscope. After prolonged adaptation to growth in liquid media, the strain grows in homogenous cell suspension.

Strain So ce90 produces chemically closely related compounds which possess antibiotic activity. In particular, these compounds exert a cytotoxic and antifungal action. To be emphasized, for example, is the inhibition of *Mucor hiemlis*.

Production of the biologically active compounds

The compounds are produced during the logarithmic to stationary growth phase.

A typical fermentation has the following course: A 100 L fermenter is filled with 60 L of medium (0.8% starch; 0.2% glucose; 0.2% soybean flour; 0.2%

yeast extract; 0.1% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 8 mg/L of Fe-EDTA; pH 7.4). It is inoculated with 10 L of a preliminary culture in the same medium but additionally grown with 50 mM of HEPES buffer of pH 7.4 in shaking flasks (160 rpm, 30°C). The fermentation is carried out at a rotational velocity of 600 rpm and aeration of 0.2 NL per m^3 per hour; the pH is maintained at 7.4 by adding KOH. The fermentation lasts 7 to 10 days. The active compounds formed are present partly in the supernatant and partly in the cells.

Alternatively, the fermentation can be done in the presence of adsorbent resins (e.g., XAD-1180, Rohm and Haas, 2-5%).

Isolation of epothilone A and B

During the fermentation of *Sorangium cellulosum* So ce90 (e.g., 70 L of fermentation volume) in the presence of an adsorbent resin (e.g., XAD-1180, Röhm and Haas, 2% v/v), the antibiotics epothilone A (Fig. 1) and B (Fig. 2) formed are completely bound to the resin. After separation of the culture broth (e.g., by sieving into a process filter), the resin is washed with 3 bed-volumes of water and eluted with 4 bed-volumes of methanol. The combined eluates are concentrated in vacuum to the water content and extracted three times with 0.2 L portions of ethyl acetate. The combined ethyl acetate extracts are evaporated to dryness (about 40 dry weight).

The crude extract is taken up in 50 mL of methanol and isocratically chromatographed with methanol/water 6:4 on Lichroprep RP-18 25-40 μm (column: 400 x 100 mm; flow rate: 200 mL/min; Merck Prepbar).

The epothilone-containing fractions (R_t about 95-125 min) are purified by RP-18 low-pressure chromatography (column 400 x 60; HD-Sil-18-20-60, Labomatic; solvent: methanol/water 65 : 35; flow rate: 25 mL/min; R_t epothilone A: 140-165 min; epothilone B: 170-195 min.

Fine purification of the epothilones is carried out by crystallization:

1. Epothilone A from toluene/ethyl acetate = 3 : 2
2. Epothilone B from ethyl acetate.

Epothilone A

$C_{26}H_{39}NO_6S$ (493)

FAB-MS (neg. ions): 429.25 for $(M-H)^-$

1H -NMR data: see Table 1.

^{13}C -NMR data: see Table 2.

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR, film on Irtran:

ν : 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979 cm^{-1} .

TLC: R_F = 0.75.

TLC – Aluminum foil 60 F₂₅₄ Merck; solvent:

Dichloromethane/methanol = 90 : 10

Detection: 1. UV extinction at 254 nm

Table 2 Spraying with vanillin-sulfuric acid reagent and heating to 120°C:
brown coloration.

HPLC: R_t = 5.4 min.

Column: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7 μ m, Merck;

Flow rate: 1.5 mL/min; solvent: methanol/water = 65 : 35

Detector: UV 254 nm.

Epothilone B

$C_{27}H_{41}NO_6S$ (507)

FAB-MS (neg. ions): 506.25 for $(M-H)^-$

1H -NMR data: see Table 1.

^{13}C -NMR data: see Table 2.

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR, film on Irtran:

ν : 3400; 2958; 2931; 2875 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149;
1049; 977 cm^{-1} .

TLC: R_F = 0.75.

TLC – Aluminum foil 60 F₂₅₄ Merck; solvent:

Dichloromethane/methanol = 90 : 10

Detection:

Table 2 Extinction at 254 nm

Table 2 Spraying with vanillin-sulfuric acid reagent and heating to 120°C:
brown coloration.

HPLC: $R_t = 6.3$ min.

Column: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 $7\ \mu\text{m}$, Merck;

Flow rate: 1.5 mL/min; solvent: methanol/water = 65 : 35

Detector: UV 254 nm.

Table 1

^1H -NMR data of epothilone A and B

Atom	A	B
2a	2.4 dd	2.22 dd
2b	2.52 dd	2.53 dd
3	4.19 dd	4.24 dd
6	3.2 m	3.28 m
7	3.78 dd	3.75 dd
8	1.73 m	1.73 m
9a	1.4 m	1.4 m
9b	1.52 m	1.5 m
10a	1.4 m	1.4 m
10b	1.4 m	1.4 m
11a	1.42 m	1.42 m
11b	1.7 m	1.7 m
12	2.9 ddd	—
13	3.01 ddd	2.8 dd
14a	1.85 ddd	1.9 ddd
14b	2.11 ddd	2.1 ddd
15	5.41 dd	5.41 dd
17	6.6 s	6.6 s
19	6.99 s	6.99 s
21*)	1.08 s	1.05 s
22*)	1.35 s	1.36 s
23	1.15 d	1.15 d
24	0.93 d	0.92 d
25	2.05 s	2.05 s
26	2.69 s	2.69 s
27	—	1.28 s

*) Assignment interchangeable.

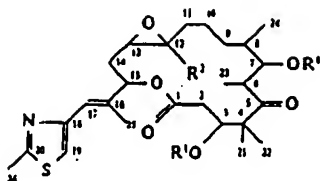
Table 2
¹³C-NMR data of epothilone A and B

Atom	A	B
1	170.5	170.5
2	39.1	39.4
3	73.2	72.9
4	53.0	53.2
5	219.9	219.8
6	43.5	43.1
7	74.7	74.3
8	36.4	36.6
9	30.7	30.9
10	23.6	22.5
11	27.6	32.3
12	57.4	61.3
13	54.6	61.7
14	31.7	32.4
15	76.8	76.9
16	137.4	137.5
17	120.1	120.0
18	152.1	152.1
19	116.3	116.2
20	165.0	165.1
21*)	20.4	19.7
22*)	21.6	21.5
23	14.1	13.7
24	17.1	17.1
25	15.6	15.7
26	19.1	19.0
27	—	22.7

*) Assignment interchangeable.

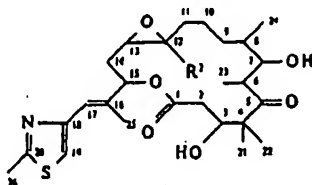
Claims

1. Epothilones of general formula



wherein R^1 represents hydrogen, C_1 - C_4 -alkyl, C_1 - C_4 -acyl, Li^+ , K^+ , Na^+ , $\frac{1}{2} Mg^{2+}$ or $\frac{1}{2} Ca^{2+}$ and R^2 is hydrogen or a methyl group.

2. Epothilones of general formula



wherein R^2 is hydrogen or methyl.

3. Epothilone characterized by one or more of the following parameters:

¹ H-NMR data		¹³ C-NMR data	
atom		atom	
2a	2.4	1	170.5
2b	2.52	2	39.1
3	4.19	3	73.2
6	3.2	4	53.0
7	3.78	5	219.9
8	1.73	6	43.5
9a	1.4	7	74.7
9b	1.52	8	36.4
10a	1.4	9	30.7
10b	1.4	10	23.6
11a	1.42	11	27.6
11b	1.7	12	57.4
12	2.9	13	54.6
13	3.01	14	31.7
14a	1.85	15	76.8
14b	2.11	16	137.4
15	5.41	17	120.1
17	6.6	18	152.1
19	6.99	19	116.3
21*)	1.08	20	165.0
22*)	1.35	21*)	20.4
23	1.15	22*)	21.6
24	0.93	23	14.1
25	2.05	24	17.1
26	2.69	25	15.6
		26	19.1

*) Assignment interchangeable,

C₂₆H₃₉NO₆S (493)

FAB-MS (neg. ions): 429.25 for (M-H)⁻

UV (MeOH) λ_{max} (log ε) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR, film on Irtran:

ν: 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087;
1029; 1014; 979 cm⁻¹.

TLC: R_F = 0.75.

TLC – Aluminum foil 60 F₂₅₄ Merck; solvent:

Dichloromethane/methanol = 90 : 10

Detection: 1. UV extinction at 254 nm

2. Spraying with vanillin-sulfuric acid reagent and heating to 120°C: brown coloration.

HPLC: $R_t = 5.4$ min.

Column: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7 μm , Merck;

Flow rate: 1.5 mL/min; solvent: methanol/water = 65 : 35

Detector: UV 254 nm.

4. Epothilone characterized by one or more of the following parameters:

H-NMR data		^{13}C -NMR data	
atom		atom	
2a	2.22 dd	1	170.5
2b	2.53 dd	2	39.4
3	4.24 dd	3	72.9
6	3.28 m	4	53.2
7	3.75 dd	5	219.8
8	1.73 m	6	43.1
9a	1.4 m	7	74.3
9b	1.5 m	8	36.6
10a	1.4 m	9	30.9
10b	1.4 m	10	22.5
11a	1.42 m	11	32.3
11b	1.7 m	12	61.3
12	—	13	61.7
13	2.8 dd	14	32.4
14a	1.9 ddd	15	76.9
14b	2.1 ddd	16	137.5
15	5.41 dd	17	120.0
17	6.6 s	18	152.1
19	6.99 s	19	116.2
21*)	1.05 s	20	165.1
22*)	1.36 s	21*)	19.7
23	1.15 d	22*)	21.5
24	0.92 d	23	13.7
25	2.05 s	24	17.1
26	2.69 s	25	15.7
27	1.28 s	26	19.0
		27	22.7

($R^1 = \text{CH}_3$)

*) Assignment interchangeable.

$C_{27}H_{41}NO_6S$ (507)

FAB-MS (neg. ions): 506.25 for (M-H)⁻

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR, film on Irtran:

ν : 3400; 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149;
1049; 977 cm^{-1} .

TLC: R_F = 0.75.

TLC – Aluminum foil 60 F₂₅₄ Merck; solvent:

Dichloromethane/methanol = 90 : 10

Detection:

1. UV extinction at 254 nm
2. Spraying with vanillin-sulfuric acid reagent and heating to 120°C: brown coloration.

HPLC: R_t = 6.3 min.

Column: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7 μm , Merck;

Flow rate: 1.5 mL/min; solvent: methanol/water = 65 : 35

Detector: UV 254 nm.

5. Process for preparing epothilones by one of the preceding claims, characterized in that the strain So ce90

- is cultivated in a medium containing carbon and nitrogen sources and mineral salts,
- an adsorbent resin is added either during or after cultivation of the strain,
- the fermenter broth is separated,
- the epothilones are eluted from the adsorbent resin and
- the eluates are freed from the solvent(s) either directly or by further purification steps
- and the various epothilones are optionally purified and separated from one another by high-pressure/low-pressure chromatography and/or by recrystallization.

6. Agent for plant protection in agriculture, forestry and/or gardening, consisting of one or more of the aforementioned epothilones or containing one or more of these epothilones, optionally in addition to one or more conventional excipients and/or diluents.

7. Agent according to Claim 6, characterized in that it is a fungicide or fungistat.

8. Therapeutic agents which develop cytostatic activities in particular and/or can effect immunosuppression, said agents consisting of one or more epothilones according to one of Claims 1 to 4 or containing one or more of these epothilones, optionally in addition to one or more conventional excipients and/or diluents.

95-045

95 48

BA

DE 4138042 A1 9322



BASIC

93176369

Z

B C D16 E1



DEUTSCHES
PATENTAMT

- ① Aktenzeichen: P 41 38 042.8
 ② Anmeldetag: 19. 11. 91
 ③ Offenlegungstag: 27. 5. 93

B2C2D16

fenl gungsschrift

41 38 042 A 1

Int. Cl.:

C 07 D 493/04
 C 12 P 17/18
 A 01 N 43/00
 A 01 N 63/00
 C 07 G 11/00
 A 61 K 31/425
 // (C07D 493/04,
 303.00) C07D 313.00,
 277.24 (C12P 17/18,
 C12R 1:01)

DE 4138042 A 1

⑪ Anmelder:

Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
(GBF), 3300 Braunschweig, DE

⑫ Vertreter:

Boeters, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Bauer, R.,
Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 8000 München

⑬ Erfinder:

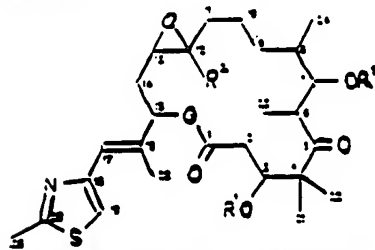
Höfle, Gerhard, Prof. Dr.; Sedorf, Norbert, Dr.;
Gerth, Klaus, Dr.; Reichenbach, Hans, Prof. Dr., 3300
Braunschweig, DE

C

Z

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑭ Epithilone, deren Herstellungsverfahren sowie sie enthaltende Mittel
 ⑮ Die Erfindung betrifft Epithilone der folgenden allgemeinen Formel



Herstellungsverfahren sowie Epithilone enthaltende Mittel.

$R^1 = H, C_1, C_2, allyl, C_1-C_4, cyclopropyl, H^+$

$R^2 = H, Me$

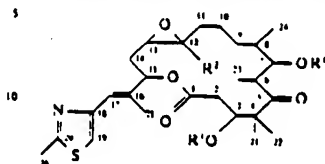
EPITHILONE DEXINS + OSTO.
~~PRODUCED~~ BY CULTIVATING
 SORANGIUM CELLULOSE +
 + FUNGICIDES AND
 FUNGISTATICS FOR
 PLANT PROTECTION
 AND PHARMACEUTICALS
 WITH CYTOTOXIC AND
 IMMUNOSUPPRESSIVE
 ACTIVITY

93176369

DE 4138042 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Epothikone der folgenden allgemeinen Formel:



worin R^1 Wasserstoff, C_1-C_4 -Alkyl, C_1-C_4 -Acyl, Li^+ , K^+ , Na^+ , $1/2 Mg^{2+}$ oder $1/2 Ca^{2+}$ bedeutet und R^2 Wasserstoff oder eine Methylgruppe darstellt.

Ferner betrifft die Erfindung eine Epothikon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

1H -NMR-Daten Atom		^{13}C -NMR-Daten Atom	
2a	2,4	1	170,5
2b	2,52	2	39,1
3	4,19	3	73,2
6	3,2	4	53,0
7	3,78	5	219,9
8	1,73	6	43,3
9a	1,4	7	74,7
9b	1,52	8	36,4
10a	1,4	9	30,7
10b	1,4	10	23,6
11a	1,42	11	27,6
11b	1,7	12	57,4
12	2,9	13	54,6
13	3,01	14	31,7
14a	1,85	15	76,8
14b	2,11	16	137,4
15	5,41	17	120,1
17	6,6	18	152,1
19	6,99	19	116,3
21 ^{*)}	1,08	20	165,0
22 ^{*)}	1,35	21 ^{*)}	20,4
23	1,15	22 ^{*)}	21,6
24	0,93	23	14,1
25	2,05	24	17,1
26	2,69	25	15,6
		26	19,1

^{*)} Zuordnung vertauschbar.

$C_{26}H_{40}NO_5S$ (493)

FAB-MS (neg. Ionen): 429,23 [(M-H)⁻]

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) = 210(4,17); 249(3,97)

IR Film auf KBr:

ν : 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979 cm^{-1}

DC: R_f = 0,75

DC-Alufolie 60 F₂₅₄, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 1

Detektion:

1. UV-Lösung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagens und Erhitzen auf 120°C, braune Anfärbung

HPLC: R_t = 3,4 min

DE 41 38 042 A1

Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7 µm, Merck;
Fluß: 1.5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35
Detektor: UV 254 nm

Des weiteren betrifft die Erfindung ein Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

¹ H-NMR-Daten Atom		¹³ C-NMR-Daten Atom	
2a	2.22 dd	1	170.5
2b	2.53 dd	2	39.4
3	4.24 dd	3	72.9
6	3.28 m	4	53.2
7	3.75 dd	5	219.8
8	1.73 m	6	43.1
9a	1.4 m	7	74.3
9b	1.5 m	8	36.6
10a	1.4 m	9	30.9
10b	1.4 m	10	22.5
11a	1.42 m	11	32.3
11b	1.7 m	12	61.3
12	—	13	61.7
13	2.8 dd	14	32.4
14a	1.9 ddd	15	78.9
14b	2.1 ddd	16	137.5
15	5.41 dd	17	120.0
17	6.6 s	18	152.1
19	6.99 s	19	116.2
21*)	1.05 s	20	165.1
22*)	1.36 s	21*)	19.7
23	1.15 d	22*)	21.5
24	0.92 d	23	13.7
25	2.05 s	24	17.1
26	2.69 s	25	15.7
27	1.28 s	26	19.0
		27	22.7

(R¹ = CH₃)

*) Zuordnung vertauscht

C₂₁H₃₃NO₅ [507]
FAB-MS (neg. Ionen): 508.25 (für (M-H)⁻)
UV (MeOH)_{max} (log ε) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf KBr:
ν = 3400; 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977 cm⁻¹

DC: R_F = 0.75
DC-Alufolie 60 F₂₅₄, Merck; Laufmittel:
Dichlormethan/Methanol = 90 : 10
Detektion:

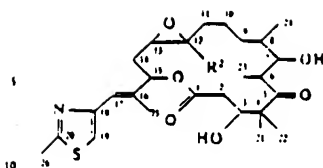
1. UV-Lösung bei 254 nm
2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagens und Erhitzen auf 120°C, braune Anfärbung

HPLC: R_t = 6.3 min
Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7 µm, Merck;
Fluß: 1.5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35
Detektor: UV 254 nm

Besonders bevorzugt sind Epothilone mit der folgenden Strukturformel

93176369

DE 41 38 042 A1



worin R; Wasserstoff oder Methyl bedeutet. (Das Kohlenstoffatom der Methylgruppe wird als C27 bezeichnet). Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Gewinn von Epothilonen, insbesondere der vorstehend charakterisierten Epothilone, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man den Stamm So ce90 DSM 6773

- in einem Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen und Mineralsalze enthaltenden Medium kultiviert,
- entweder während der Kultivierung des Stammes oder anschließend ein Adsorberharz zusetzt,
- die Fermenterbrühe abtrennt,
- die Epothilone aus dem Adsorberharz eluiert und
- die Eluate direkt oder über weitere Reinigungsschritte von dem/den Lösungsmittel(n) befreit,
- und gegebenenfalls über Hochdruck/Niederdruckchromatographie und/oder Umkristallisation die verschiedenen Epothilone aufreingt und voneinander trennt.

Gegebenenfalls können die so gewonnenen Epothilone mit gängigen chemischen Verfahren weiter umgesetzt werden, z. B. mit Basen in die Alkali- und Erdalkalisalze überführt und gegebenenfalls weiter zu Ethern umgesetzt werden, oder sie können mit organischen Säuren in die entsprechenden Ester überführt werden.

Ferner betrifft die Erfindung ein Mittel für den Pflanzenschutz in Landwirtschaft, Forstwirtschaft und/oder Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilone oder eines oder mehrere dieser Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Schließlich betrifft die Erfindung ein therapeutisches Mittel, das insbesondere cytotoxische Aktivitäten entwickeln und/oder Immunsuppression bewirken kann, bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilone oder eines oder mehrere dieser Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen und experimentellen Daten näher erläutert.

Produktionsstamm

Stamm So ce90 wurde im Juli 1983 an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) aus einer Bodenprobe von den Ufern des Zambesi, Südafrika, isoliert. Der Stamm ist bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ) unter Nr. 6773 hinterlegt.

Stammkultur und morphologische Beschreibung: Der Stamm wächst auf Cellulose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle mit KNO_3 als einzige Stickstoffquelle, z. B. auf Filterpapier über ST21 Mineralsalzagar (0,1% KNO_3 ; 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,1% K_2HPO_4 ; 0,01% $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,02% FeCl_3 ; 0,002% Hefeextrakt; Standard-Spurenelementlösung; 1% Agar). Auf diesem Medium werden dunkelrotbraune bis schwarzbraune Fruchtkörper gebildet, bestehend aus kleinen Sprangliedern (etwa 15 bis 30 μm Durchmesser) in mehr oder weniger großen dichten Haufen und Paketen.

Der Stamm wächst sehr gut mit Glucose und KNO_3 , z. B. auf CA2-Agar (Grundmedium: 1,5 g Agar in 92 ml Aqua dest.; Stammlösung 1: 7,5% KNO_3 , 7,5% K_2HPO_4 in Aqua dest.; Stammlösung 2: 1,5% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ in Aqua dest.; Stammlösung 3: 0,2% $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,15% FeCl_3 in Aqua dest.; Stammlösung 4: 20% Glucose in Aqua dest.). Die Stammlösungen werden durch Autoklavieren sterilisiert. Je 1 ml der Lösungen 1 bis 3 sowie 5 ml der Lösung 4 werden dem Grundmedium zugegeben, ebenso eine geeignete Menge einer Spurenelementlösung.

Die vegetativen Stäbchen haben für Sorangium typischen Form (relativ derbe, im Phasenkontrastmikroskop dunkle, zylindrische Stäbchen mit breiten abgerundeten Enden, im Mittel 3–6 μm lang und 1 μm dick). Nach längerer Adaptation an das Wachstum in Flüssigmedien wächst der Stamm in homogener Zellsuspension.

Der Stamm So ce90 produziert chemisch nahe verwandte Verbindungen, die antibiotische Aktivität besitzen. Insbesondere sind diese Verbindungen cytotoxisch sowie antifungal wirksam. Hervorzuheben ist z. B. die Hemmung von *Mucor hiemalis*.

Produktion der biologisch aktiven Verbindungen

Die Verbindungen werden während der logarithmischen bis hin zur stationären Wachstumsphase produziert.

Eine typische Fermentation verläuft folgendermaßen: Ein 100 l-Fermenter wird mit 60 l Medium (0,8% Stärke; 0,2% Glucose; 0,2% Soymehl; 0,2% Hefeextrakt; 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 8 mg/l Fe-EDTA; pH 7,4) gefüllt. Beimpf wird mit 10 l einer im gleichen Medium jedoch zusätzlich mit 50 mM HEPES-Puffer pH 7,4 in Schüttelkolben angezogenen Vorkultur (160 upm, 30°C). Fermentiert wird bei 32°C mit einer Rührgeschwindigkeit von 500 upm und einer Belüftung von 0,2 NL pro m³ und Std. der pH-Wert wird durch Zugabe von KOH bei

93176369

DE 41 38 042 A1

7,4 gehalten. Die Fermentation dauert 7–10 Tage. Die gebildeten aktiven Verbindungen befinden sich teils im Überstand und teils in den Zellen.

Alternativ dazu kann in Gegenwart von Adsorberharzen (z. B. XAD-1180, Rohm und Haas, 2–5%) fermentiert werden.

Isolierung von Epothilon A und B

Während der Fermentation von *Sorangium cellulosum* So ce90 (z. B. 70 l Fermentationsvolumen) in Gegenwart eines Adsorberharzes (z. B.: XAD-1180, Rohm und Haas, 2% v/v) werden die gebildeten Antibiotika Epothilon A (Abb. 1) und B (Abb. 2) vollständig an das Harz gebunden. Nach Abtrennung der Kulturbrothe (z. B. durch Absieben in einem Prozeßfilter) wird das Harz mit 3 Bettvolumen Wasser gewaschen und mit 4 Bettvolumen Methanol eluiert. Die vereinigten Eluate werden im Vakuum bis auf den Wassergehalt eingedunstet und dreimal mit je 0,2 l Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetatextrakte werden zur Trockne eingedunstet (ca. 40 g Trockengewicht).

Der Rohextrakt wird in 50 ml Methanol aufgenommen und an Lichroprep RP-18 25–40 µm (Säule: 400 × 100 mm; Fluß: 200 ml/min; Merck Prepbar) isokratisch mit Methanol/Wasser 6/4 chromatographiert. Die Epothilone enthaltenden Fraktionen (R_f ca. 95–125 min) werden durch RP-18 Niederdruckchromatographie aufgereinigt. (Säule 400 × 60; HD-Sil-18-20-60, Labomatic; Laufmittel: Methanol/Wasser 65/35; Fluß 25 ml/min; R. Epothilon A: 140–165 min; R. Epothilon B: 170–195 min).

Die Feinreinigung der Epothilone erfolgt durch Kristallisation aus

1. Epothilon A: Toluol/Ethylacetat = 3 : 2
2. Epothilon B: Ethylacetat

Epothilon A

$C_{27}H_{42}NO_6$ [493]

FAB-MS (neg. Ionen): 429,25 für (M-H)⁻

¹H-NMR-Daten s. Tab. 1

¹³C-NMR-Daten s. Tab. 2

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) = 210 (4,17); 249 (3,97)

IR Film auf KBr:

ν : 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979 cm^{-1}

DC: R_f = 0,75

DC-Alufolie 60 F₂₅₄, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Dektion: 1. UV-Lösung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzen auf 120°C, braune Anfärbung

HPLC: R_f = 5,4 min

Säule: 4 × 250 mm Lichrosorb RP-18 7 µm, Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

Epothilon B

$C_{27}H_{42}NO_6$ [507]

FAB-MS (neg. Ionen): 506,25 für (M-H)⁻

¹H-NMR-Daten s. Tab. 1

¹³C-NMR-Daten s. Tab. 2

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) = 210 (4,17); 249 (3,97)

IR Film auf KBr:

ν = 3400; 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977 cm^{-1}

DC: R_f = 0,75

DC-Alufolie 60 F₂₅₄, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Dektion:

1. UV-Lösung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzen auf 120°C, braune Anfärbung

HPLC: R_f = 6,3 min

Säule: 4 × 250 mm Lichrosorb RP-18 7 µm, Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

93176369

DE 41 38 042 A1

Tabelle I

¹H-NMR-Daten der Epothilone A und B

Atom	A	B
2a	2.4 dd	2.22 dd
2b	2.52 dd	2.53 dd
3	4.19 dd	4.24 dd
6	3.2 m	3.28 m
7	3.78 dd	3.73 dd
8	1.73 m	1.73 m
9a	1.4 m	1.4 m
9b	1.52 m	1.5 m
10a	1.4 m	1.4 m
10b	1.4 m	1.4 m
11a	1.42 m	1.42 m
11b	1.7 m	1.7 m
12	2.9 ddd	—
13	3.01 ddd	2.8 dd
14a	1.85 ddd	1.9 ddd
14b	2.11 ddd	2.1 ddd
15	5.41 dd	5.41 dd
17	6.6 s	6.6 s
19	6.99 s	6.99 s
21 ^{*)}	1.08 s	1.05 s
22 ^{*)}	1.35 s	1.36 s
23	1.15 d	1.15 d
24	0.93 d	0.92 d
25	2.05 s	2.05 s
26	2.69 s	2.69 s
27	—	1.28 s

^{*)} Zuordnung vertauschbar

93176369

DE 41 38 042 A1

Tabelle 2

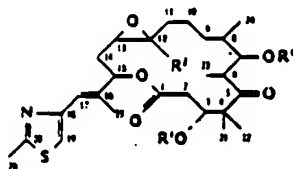
¹³C-NMR-Daten der Epothilone A und B

Atom	A	B
1	170,5	170,5
2	39,1	39,4
3	73,2	72,9
4	53,0	53,2
5	219,9	219,8
6	43,5	43,1
7	74,7	74,3
8	36,4	36,6
9	30,7	30,9
10	23,6	22,5
11	27,6	32,3
12	57,4	61,3
13	54,6	61,7
14	31,7	32,4
15	76,8	76,9
16	137,4	137,5
17	120,1	120,0
18	152,1	152,1
19	116,3	116,2
20	165,0	165,1
21*)	20,4	19,7
22*)	21,6	21,5
23	14,1	13,7
24	17,1	17,1
25	15,6	15,7
26	19,1	19,0
27	-	22,7

*) Zuordnung vertauscht

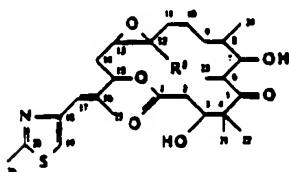
Patentansprüche

1. Epothilone der allgemeinen Formel:



worin R¹ Wasserstoff, C₁-C₄-Alkyl, C₁-C₄-Acyl, Li⁺, K⁺, Na⁺, 1/2 Mg²⁺ oder 1/2 Ca²⁺ bedeutet und R² Wasserstoff oder eine Methylgruppe darstellt.

2. Epothilone der allgemeinen Formel:



worin R¹ Wasserstoff oder Methyl ist.

3. Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

	¹ H-NMR-Daten		¹³ C-NMR-Daten	
	Atom		Atom	
5	2a	2,4	1	170,3
	2b	2,52	2	39,1
	3	4,19	3	73,2
	6	3,2	4	53,0
10	7	3,78	5	219,8
	8	1,73	6	43,5
	9a	4	7	74,7
	9b	5,2	8	36,4
15	10a	1,4	9	30,7
	10b	1,4	10	23,8
	11a	1,42	11	27,8
	11b	1,7	12	57,4
20	12	2,9	13	54,6
	13	3,01	14	31,7
	14a	1,83	15	76,8
	14b	2,11	16	137,4
25	15	5,41	17	120,1
	17	6,8	18	152,1
	19	6,99	19	116,3
	21*)	1,08	20	163,0
30	22*)	1,35	21*)	20,4
	23	1,15	22*)	21,6
	24	0,93	23	14,1
	25	2,05	24	17,1
	26	2,69	25	15,8
			26	19,1

*) Zuordnung vertauschbar.

C20H21NO6S (493)

FAB-MS (neg. Ionen): 492,25 für (M-H)⁻

UV (MeOH) λ_{max} (log ε) = 210 (4,17); 249 (3,97)

IR: Film auf Irtran:

ν: 3429; 2964; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979 cm⁻¹

DC: R_F = 0,73

DC: Alufolie 60 F₅₀, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion:

1. UV-Lösung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanilin/Schwefelsäure-Reagenz und Erhitzen auf 120°C. braune Anfärbung

HPLC: R_t = 5,4 min

SSule: 4 × 250 mm Lichrosorb RP-18 7 μm, Merck:

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

4. Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

93176369

¹ H-NMR-Daten		¹³ C-NMR-Daten	
Atom		Atom	
2a	2.22 dd	1	170.5
2b	2.53 dd	2	39.4
3	4.24 dd	3	72.9
6	3.28 m	4	53.2
7	3.75 dd	5	219.8
8	1.73 m	6	43.1
9a	1.4 m	7	74.3
9b	1.5 m	8	36.6
10a	1.4 m	9	30.9
10b	1.4 m	10	22.5
11a	1.42 m	11	32.3
11b	1.7 m	12	61.3
12	—	13	61.7
13	2.8 dd	14	32.4
14a	1.9 ddd	15	76.9
14b	2.1 ddd	16	137.5
15	3.41 dd	17	120.0
17	6.6 s	18	152.1
19	6.99 s	19	116.2
21*)	1.05 s	20	165.1
22*)	1.36 s	21*)	19.7
23	1.15 d	22*)	21.5
24	0.92 d	23	13.7
25	2.05 s	24	17.1
26	2.69 s	25	15.7
27	1.28 s	26	19.0
		27	22.7

(R' = CH₃)

*) Zuordnung vertauschbar

C₂₇H₄₁NO₆S[507]
 FAB-MS (neg. Ionen): 506.25 für (M-H)⁻
 UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf KBr:
 ν = 3400; 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977 cm⁻¹

DC: R_F = 0.75
 DC-Alufolie 60 F₂₅₄, Merck; Laufmittel:
 Dichlormethan/Methanol = 90:10

Detektion:
 1. UV-Lösung bei 254 nm
 2. Ansprüchen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzt auf 120°C, braune Anfärbung

HPLC: R_t = 6.3 min
 Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7 μ m, Merck;
 Fluß: 1.5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65:35
 Detektor: UV 254 nm

- Verfahren zum Herstellen von Epothilonen nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man den Stamm So ce90
 - in einem Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen und Mineralsalze enthaltenden Medium kultiviert,
 - entweder während der Kultivierung des Stammes oder anschließend ein Adsorberharz zusetzt,
 - die Fermenterbrühe abtrennt,
 - die Epothilone aus dem Adsorberharz eluiert und
 - die Eluate direkt oder über weitere Reinigungsschritte von dem/den Lösungsmittel(n) befreit,
 - und gegebenenfalls über Hochdruck/Niederdruckchromatographie und/oder Umkristallisation die verschiedenen Epothilone aufreingt und voneinander trennt.
- Mittel für den Pflanzenschutz in der Landwirtschaft und Forstwirtschaft und/oder im Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren Epothilonen gemäß einem der voranstehenden Ansprüche oder eines oder mehrerer dieser Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).
- Mittel nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Fungizid oder Fungizistilium ist.

93176369

DE 41 38 042 A1

8. Therapeutisches Mittel, das insbesondere cytotoxische Aktivitäten entwickeln und/oder Immunsuppression bewirken kann, bestehend aus einem oder mehreren Epothilonen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder diese Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

10

93176369

BA

50.degree. and the reaction mixt. was adjusted to pH 7 with 1 M phosphate buffer to give 2 isomers, each in 19% yield.

L4 ANSWER 14 OF 15 CAPLUS COPYRIGHT 1999 ACS
 ACCESSION NUMBER: 1997:443365 CAPLUS
 DOCUMENT NUMBER: 127:81289
 TITLE: Preparation of epothilone derivatives as agrochemicals and pharmaceuticals
 INVENTOR(S): Hofle, Gerhard; Kiffe, Michael
 PATENT ASSIGNEE(S): Gesellschaft Fur Biotechnologische Forschung Mbh (Gbf), Germany; Hofle, Gerhard; Kiffe, Michael
 SOURCE: PCT Int. Appl., 38 pp.
 CODEN: PIXXD2
 DOCUMENT TYPE: Patent
 LANGUAGE: German
 FAMILY ACC. NUM. COUNT: 2
 PATENT INFORMATION:

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
WO 9719085	A1	19970529	WO 96-EP5080	19961118
W: JP, US RW: AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE				
DE 19542986	A1	19970522	DE 95-19542986	19951117
DE 19639456	A1	19980326	DE 96-19639456	19960925
EP 873341	A1	19981028	EP 96-939097	19961118
R: AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE, MC, PT, IE, FI				
PRIORITY APPLN. INFO.:			DE 95-19542986	19951117
			DE 96-19639456	19960925
			WO 96-EP5080	19961118

OTHER SOURCE(S): MARPAT 127:81289
 AB The title compds., e.g., I [R = H, C1-4 alkyl; R1, R2 = H, C1-6 alkyl, C1-6 acyl, benzoyl, C1-4 trialkylsilyl, benzyl, Ph, C1-6 alkoxy, C6 alkyl-, hydroxy-, and halo-substituted benzyl or phenyl; X, Y = H, halo, pseudohalo, OH, acyloxy, alkoxy, benzoyloxy; or YZ = O, bond; however, I may not be epothilone A or B], useful as agrochems. and pharmaceuticals (no data), are prepd. Thus, epothilone A in acetone contg. trifluoroacetic acid was heated overnight at 50.degree. and the reaction mixt. was adjusted to pH 7 with 1 M phosphate buffer to give 2 isomers, each in 19% yield.

L4 ANSWER 15 OF 15 CAPLUS COPYRIGHT 1999 ACS
 ACCESSION NUMBER: 1994:52841 CAPLUS
 DOCUMENT NUMBER: 120:52841
 TITLE: Epothilone derivatives
 INVENTOR(S): Hofle, Gerhard; Bedorf, Norbert; Gerth, Klaus; Reichenbach, Hans
 PATENT ASSIGNEE(S): Gesellschaft fuer Biotechnologische Forschung mbH (GBF), Germany
 SOURCE: Ger. Offen., 10 pp.
 CODEN: GWXXBX
 DOCUMENT TYPE: Patent
 LANGUAGE: German
 FAMILY ACC. NUM. COUNT: 1
 PATENT INFORMATION:

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
DE 4138042	A1	19930527		
DE 4138042	C2	19931014	DE 91-4138042	19911119
WO 9310121	A1	19930527	WO 92-EP2656	19921119
W: AU, CA, FI, HU, JP, KR, NO, US				
RW: AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE				
AU 9229437	A1	19930615	AU 92-29437	19921119
PRIORITY APPLN. INFO.:			DE 91-4138042	19911119
			WO 92-EP2656	19921119

OTHER SOURCE(S): MARPAT 120:52841

AB Fungicidal antibiotic epothilones I (R1 = H, alkyl, acyl, Li, etc.; R2 = H, Me) and a fermentative process for their prepn. are claimed. The process for their prepn. comprises the fermn. of Sorangium cellulosum in the presence of a resin. During the fermn. epothilone A (R1 = R2 = H) and epothilone B (R1 = H, R2 = Me) are bound to the resin. Agrochem. fungicides contg. epothilone A and epothilone B